



Klinika Hematologii
tel. 47 722 21 03, e-mail: hematologia@cskmswia.gov.pl

Warszawa, 10 listopada 2024

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agaty Majchrzak pt. „Ocena aktywności inhibitorów szlaków *mTOR* i *NFκB* oraz białka *BCL-2* na komórki chłoniaka rozlanego z dużych komórek B” przygotowanej pod kierunkiem dr hab. med. Pawła Robaka

Chłoniaki z dużych komórek B (zgodnie z aktualną klasyfikacją WHO z 2022r.) to heterogenna grupa nowotworów układu chłonnego, obejmująca obecnie 18 jednostek chorobowych, które różnią się biologią i rokowaniem, a w związku z tym często również metodami leczenia. Najczęstszym z nich jest chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL), dlatego też większość badań klinicznych dotyczy właśnie chorych na DLBCL. W zależności od pochodzenia komórek wyróżniamy dwa podtypy DLBCL: GCB (*germinal center B-cell*) oraz ABC (*activated B-cell*), przy czym ten drugi podtyp cechuje się gorszym rokowaniem i odpowiedzią na standardową immunochemioterapię. W ostatnich latach obserwuje się istotny postęp w leczeniu chorych na DLBCL, który początkowo dotyczył głównie chorych na oporną/nawrotową postać chłoniaka, a obecnie również terapii 1. linii chorych z gorszymi wskaźnikami rokowniczymi. Szczególnie zwiększyła się rola immunoterapii, zarówno komórkowej w postaci CAR-T, jak również przeciwciał bispecyficznych czy przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z lekiem cytostatycznym. Wciąż jednak pozostaje grupa chorych, opornych na dostępne metody leczenia, dlatego poszukiwanie nowych metod terapii ma bardzo istotne znaczenie, zwłaszcza tych o odmiennych niż stosowane dotychczas mechanizmach działania.

W swojej pracy doktorskiej mgr Agata Majchrzak jako cel badawczy postawiła sobie określenie cytotoksycznego wpływu inhibitorów określonych szlaków molekularnych i inhibitorów białka Bcl-2 (w monoterapii i w skojarzeniach) na linie komórkowe chłoniaka DLBCL (podtypy ABC i GCB) oraz chłoniaka pierwotnego śródpiersia z komórek B (PMBCL). Doktorantka podjęła próbę analizy mechanizmów działania badanych cząsteczek, w tym efektu proapoptotycznego i aktywacji drogi kaspazowej. Uważam, że jest to ciekawy tematem badawczy z uwagi na istotną potrzebę poszukiwania nowych metod leczenia agresywnych chłoniaków.

Przedstawiona do recenzji praca ma układ typowy dla rozprawy doktorskiej, zawiera 77 stron tekstu, zawiera 22 ryciny i 7 tabel. Spis piśmiennictwa obejmuje 74 odpowiednio dobrane i cytowanych pozycje.

We Wstępie pracy zawa Autorka przedstawia aktualny stan wiedzy na temat chłoniaka DLBL w kontekście klasyfikacji, epidemiologii, objawów klinicznych, kryteriów diagnostycznych, czynników rokowniczych i leczenia. Opisuje również podłoże molekularne choroby z uwzględnieniem podtypów GCB i ABC, co ma znaczenie w kontekście prowadzonych badań. W kolejnym rozdziale opisuje chłoniaka pierwotnego śródpiersia z komórek B. Ważną część tej części pracy stanowi charakterystyka zaburzeń białek regulujących procesy apoptozy oraz szlaków NFkB i mTOR, a Wstęp zamyka charakterystyka badanych inhibitorów: ABT199 (inhibitor białka Bcl-2), AZD2014 (inhibitor kinazy serynowo-treoninowej mTOR), IMD0354 (inhibitor NFkB). Całość stanowi spójną, interesującą całość i świadczy o szczegółowej znajomości zagadnień stanowiących przedmiot badań. Jest to równocześnie doskonałe wprowadzenie do dalszej części rozprawy. Moje uwagi do tej części pracy dotyczą obecnej klasyfikacji WHO 2022, według której DLBCL i PMBCL należą do grupy chłoniaków z dużych komórek B (large B-cell lymphoma), a w tytule rozprawy wymieniony jest jedynie chłoniak DLBCL, brakuje PBMCL. Ponadto, z niektórych fragmentów pracy można wywnioskować, że PMBCL jest podtypem DLBCL. Uważam, że rozdział 4 należałoby zatytułować raczej „Zaburzenia białek regulujących apoptozę i wybrane szlaki molekularne w chłoniakach B-komórkowych” niż „Zaburzenia w chłoniakach B-komórkowych” ponieważ jest tytuł zbyt ogólny. Podobna uwaga dotyczy następnego podrozdziału, czyli „Inhibitory” – tu również należałoby napisać co hamują badane inhibitory.

Badania przeprowadzono na następujących liniach komórkowych: TOLEDO (DLBCL, podtyp GCB), RIVA (DLBCL, podtyp ABC) oraz KARPAS (PMBCL). W przypadku każdej linii komórkowej, poszczególne inhibitory stosowano w monoterapii, w połączeniu 2-lekowym każdej z cząsteczek, oraz jako połączenie 3 leków.

Apoptozę oceniano metodą cytometrii przepływowej przy użyciu jodku propidyny, Anneksyny V, analizowano również spadek potencjału mitochondrialnego oraz aktywację kaspaz. Metodyka badań jest adekwatna do założonego celu, została opisana w sposób czytelny, świadczący o doświadczeniu doktorantki w stosowaniu opisanych technik badawczych. W pracy zastosowano prawidłowe metody analizy statystycznej.

W przeprowadzonych badaniach Doktorantka wykazała, że najsilniejsze właściwości cytotoksyczne w przypadku linii RIVA (podtyp ABC chłoniaka DLBCL) w monoterapii miał wenetoklaks. Natomiast spośród kombinacji 2 leków najsilniejszy efekt cytotoksyczny wywoływało połączenie ABT-199 z AZD2014. Zastosowanie trzech leków nie wpływało na zwiększenie cytotoksyczności. Badania na linii TOLEDO (postać GCB chłoniaka DLBCL) wykazały podobne działanie wszystkich ocenianych inhibitorów w monoterapii, a w połączeniu 2-lekowym największe działanie cytotoksyczne miało skojarzenie wenetoklaksu z AZD2014. Połączenie 3 leków nie wpływało na silniejsze działanie proapoptotyczne. W przypadku linii komórkowej KARPAS uzyskano podobne wyniki jak w badaniach na linii RIVA. Pojedynczo najsilniej proapoptotycznie działał wenetoklaks a przy połączeniu 2 leków wenetoklaks w skojarzeniu z AZD2014. Połączenie 3 leków nie wykazywało przewagi nad połączeniami 2-lekowymi.

Podsumowując uzyskane wyniki - wenetoklaks był zdecydowanie najsilniejszym lekiem w odniesieniu do bardziej agresywnego podtypu chłoniaka DLBCL – ABC, jak również chłoniaka PMBCL. Rozwój tej cząsteczki w leczeniu chorych na DLBCL ograniczył obserwowany w trakcie terapii rozwój lekooporności, w związku z czym możliwe jest, że leczenie byłoby bardziej skuteczne, gdyby stosowano inhibitor Bcl-2 np. w połączeniu z inhibitorem szlaku mTOR. Takie połączenie warto byłoby ocenić w kolejnych badaniach. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę, są interesujące również w aspekcie różnic w odpowiedzi na wenetoklaks między podtypami ABC i GCB

chłoniaka DLBCL, wynikające zapewne z ich odmiennej biologii. Omówienie wyników i Dyskusja świadczą o dobrym przygotowaniu Doktorantki do podjętego tematu. W Dyskusji Autorka krytycznie ustosunkowała się do wyników badań własnych, w oparciu o najnowszą wiedzę próbując logicznie je interpretować. Na zakończenie Doktorantka przedstawia trzy wnioski, w których należałoby byłoby bardziej odnieść się do interpretacji uzyskanych wyników, zamiast tylko je streścić. Ponadto, w omówieniu wyników brakuje odniesienia do celu pracy dotyczącego badania mechanizmów działania ocenianych cząsteczek na komórki wybranych chłoniaków.

Reasumując uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Agaty Majchrzak pt. „Ocena aktywności inhibitorów szlaków *mTOR* i *NFκB* oraz białka *BCL-2* na komórki chłoniaka rozlanego z dużych komórek B” spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. Z 2017r., poz. 1789). Badania wykonane w ramach pracy doktorskiej przyniosły cenne obserwacje, istotne dla rozwoju wiedzy na temat cytotoksycznego działania inhibitorów Bcl-2 i określonych szlaków molekularnych, stanowiąc przesłankę do dalszego rozwoju badań nad nowymi metodami leczenia agresywnych chłoniaków. Doktorantka wykazała się zarówno wiedzą teoretyczną jak również umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Praca została przygotowana z dużą starannością, zarówno pod względem językowym jak i ilustracyjnym.

Z uwagi na powyższe mam zaszczyt i przyjemność przedłożyć Radzie Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie mgr Agaty Majchrzak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
KLINIKI HEMATOLOGII
Państwowego Instytutu Medycznego MSWiA
prof. dr hab. n. med. Iwona Hlus